

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ :

A61K 31/185

A1

(11) Numéro de publication internationale:

WO 99/36066

(43) Date de publication internationale:

22 juillet 1999 (22.07.99)

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00059

(22) Date de dépôt international: 14 janvier 1999 (14.01.99)

(30) Données relatives à la priorité:

98/00453

16 janvier 1998 (16.01.98)

FR

(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75794 Paris Cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LLORENS-CORTES, Catherine [FR/FR]; 9, avenue de la Promenade, F-91440 Bures sur Yvette (FR). CORVOL, Pierre [FR/FR]; 88, rue de Sèvres, F-75015 Paris (FR). FOURNIE-ZALUSKI, Marie-Claude [FR/FR]; 16, avenue de Bouvines, F-75011 Paris (FR). ROQUES, Bernard, Pierre [FR/FR]; 38, rue Cabanis, F-75014 Paris (FR).

(74) Mandataires: MONCHENY, Michel etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

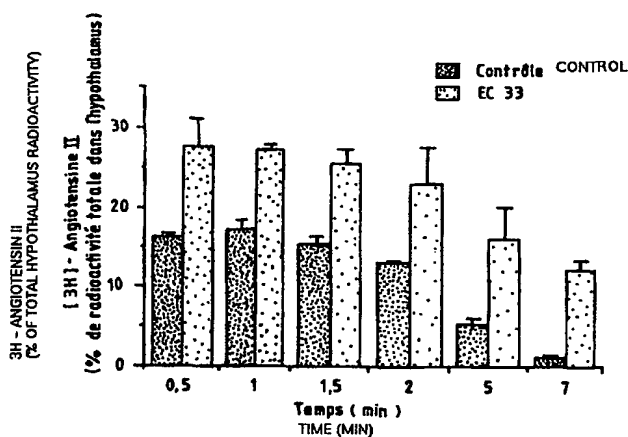
Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING AT LEAST ONE AMINOPEPTIDASE A INHIBITOR

(54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE COMPRENANT AU MOINS UN INHIBITEUR DE L'AMINOPEPTIDASE A



(57) Abstract

The invention relates primarily to a pharmaceutical composition which can be used for lowering arterial blood pressure and is characterized in that it contains as active ingredient at least one selective aminopeptidase A inhibitor. Said inhibitor can notably be (S) 3-amino-4-mercaptopbutyl sulfonic acid or one of its salts.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet principal une composition pharmaceutique utile pour diminuer la pression artérielle caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un inhibiteur sélectif de l'aminopeptidase A. Cet inhibiteur peut être notamment l'acide (S) 3-amino-4-mercaptopbutylsulfonique ou l'un de ses sels.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

"Composition pharmaceutique comprenant au moins un inhibiteur de l'aminopeptidase A"

La présente invention se rapporte à une composition pharmaceutique utile pour traiter notamment les troubles liés à une hypertension artérielle.

5 L'hypertension artérielle est une maladie dont les causes sont encore inconnues. Toutefois, on sait que le système nerveux central joue un rôle important dans la régulation du système cardio-vasculaire en contrôlant à la fois l'activité du système nerveux sympathique autonome et du baro-réflexe ainsi que la libération d'hormones hypophysaires.

10 De même, des travaux cliniques et expérimentaux suggèrent que l'activité du système nerveux central et des nerfs sympathiques périphériques participent à la genèse de l'hypertension artérielle.

Il a également été montré qu'un système rénine-angiotensine existait en outre dans le système nerveux central. Il s'avère qu'il contrôle les
15 fonctions cardio-vasculaires et l'homéostasie des fluides corporels. Tous les composants du système rénine-angiotensine systémique, y compris les précurseurs et enzymes nécessaires à la formation et la dégradation des angiotensines, de même que les récepteurs d'angiotensine ont déjà été identifiés à l'intérieur du cerveau.

20 Dans le système rénine-angiotensine systémique, on sait en particulier que l'angiotensine II est générée sous l'action d'une enzyme essentiellement membranaire appartenant au groupe des métalloprotéases à zinc. Cette ectopeptidase est connue sous le nom d'enzyme de conversion de
25 l'angiotensine (ECA) car elle transforme le peptide inactif angiotensine I en angiotensine II.

Il s'avère que cette angiotensine II est transformée in vivo en angiotensine III (AngIII) sous l'action d'une autre ectopeptidase à zinc, récemment clonée, l'aminopeptidase A (APA), qui élimine le résidu aspartyl N-
30 terminal de l'angiotensine II pour conduire à l'angiotensine III. Cette angiotensine III est elle-même détruite par diverses peptidases dont notamment l'aminopeptidase N (APN).

Ces deux ectopeptidases à zinc, APA et APN appartiennent au groupe d'enzymes de type thermolysine et possèdent une homologie significative entre leurs séquences d'acides aminés.

Il a été démontré que l'inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, ECA, présente dans le système rénine-angiotensine systémique, conduit via un blocage de la formation de l'angiotensine II, à une baisse de la pression artérielle particulièrement sensible chez les personnes souffrant d'hypertension. Il s'avère que ces inhibiteurs bloquent l'ECA périphérique à la fois dans la circulation et surtout dans de nombreux tissus : endothélium vasculaire, poumon, rein, etc.

En conséquence, jusqu'ici il était proposé que l'angiotensine II était le médiateur principal du système rénine-angiotensine cérébral par analogie au système périphérique.

15

En fait, contrairement à ce qu'il était admis, il semble que dans le système rénine-angiotensine cérébral, l'étape critique ne serait pas la formation de l'angiotensine II par action de l'ECA sur l'angiotensine I mais la formation de l'angiotensine III par action de l'APA sur l'angiotensine II. Ce rôle déterminant de l'angiotensine III dans le système rénine-angiotensine cérébral est notamment conforté par les résultats figurant dans l'exemple 4 ci-après.

20

L'ensemble de ces données tendent donc à identifier l'angiotensine III comme le peptide effecteur du système rénine-angiotensine cérébral, responsable de l'augmentation de la pression artérielle. Plus précisément, dans le cerveau, il apparaît que l'Ang III exerce un effet stimulateur tonique sur le contrôle central de la pression artérielle.

25

La présente invention repose précisément sur la mise en évidence que l'angiotensine III joue un rôle essentiel dans le contrôle de la pression artérielle au niveau central.

30

Plus particulièrement, la présente invention vise à proposer une composition pharmaceutique permettant de diminuer la pression artérielle et donc de s'opposer à une augmentation de la pression induite par l'angiotensine III.

5

Plus précisément, elle revendique une composition pharmaceutique utile pour diminuer la pression artérielle, caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins un inhibiteur sélectif de l'aminopeptidase A.

10

Comme évoqué précédemment, l'aminopeptidase A (APA) est une ectoenzyme appartenant à la famille des métalloprotéases à zinc et dont la thermolysine constitue le modèle bactérien.

15

L'APA est une glycoprotéine qui se présente sous la forme d'un homodimère.

Le clonage de son ADNc a révélé que chaque monomère est composé d'un domaine d'ancrage séparant un court segment cytosolique N-terminal d'un large domaine extracellulaire C-terminal qui contient le site actif dont plus particulièrement le site liant le zinc.

20

Or, il s'avère que l'APA présente 34 % d'identité de séquence en acides aminés avec l'APN, impliquée pour sa part dans la dégradation de l'angiotensine III. Cette homologie est par ailleurs la plus élevée au niveau précisément du site actif présent dans le domaine extracellulaire glycosylé.

25

Il est clair que cette homologie de séquence entre l'APA et l'APN constitue un handicap pour obtenir des inhibiteurs spécifiques et sélectifs à l'égard de l'APA.

30

Comme évoqué ci-dessus, l'inhibiteur mis en oeuvre dans la composition revendiquée est un inhibiteur sélectif à l'égard de l'APA. Cette sélectivité se traduit notamment par une affinité multipliée environ d'au moins un facteur 100 pour l'APA comparativement à l'APN.

Plus précisément, est considérée selon l'invention comme un inhibiteur sélectif à l'égard de l'APA, une molécule qui répond au moins à l'un des critères suivants :

5 - son pouvoir inhibiteur sur l'APA *in vitro* est inférieur ou égal à 10^{-7} M,

- elle présente un facteur de sélectivité d'environ 100 par rapport aux enzymes aminopeptidase N, aminopeptidase B (EC 3.4.11.6), endopeptidase neutre (EC 3.4.24.11), et l'enzyme de conversion de l'angiotensine (EC 3.4.15.1).

10 - injectée *in vivo* par voie intracérébroventriculaire ou systémique (si elle traverse la barrière hématoencéphalique), elle bloque la formation de l'angiotensine III.

Comme inhibiteur de l'APA convenant tout particulièrement à l'invention, on peut notamment citer l'acide (S) 3-amino-4-mercaptobutylsulfonique ou l'un de ses sels avec un acide ou une base pharmaceutiquement acceptable.

20 Comme il ressort des exemples présentés ci-après, le (S) 3-amino 4-mercaptobutylsulfonate de sodium, désigné ci-après sous le symbole EC33, présente une activité inhibitrice significative à l'égard de l'APA.

Cet inhibiteur présente avantageusement un facteur de sélectivité de 100 par rapport à l'aminopeptidase N.

25 Injecté chez la souris par voie intracérébroventriculaire, à raison de 30 µg, on note une augmentation significative de la demi-vie de l'angiotensine II (30 µg), d'un facteur de l'ordre de 2,6 comparativement à celle observée chez un animal témoin. Parallèlement, il bloque totalement la formation de l'angiotensine III au niveau de l'hypothalamus.

30 De même, des expériences réalisées chez des rats normotendus (WKY) ou hypertendus (SHR) montrent que l'injection de l'EC33 permet de diminuer significativement la pression artérielle. L'effet hypotenseur de cet inhibiteur de l'APA, l'EC33, est maximal pour une dose de 100 µg. Il est

de -22 mmHg chez le rat normotendu et de -28 mmHg chez le rat hypertendu. La durée d'action à cette dose est en moyenne entre 40 et 60 minutes.

Ces résultats montrent donc que l'APA, l'enzyme responsable de la production d'angiotensine III dans le système nerveux central constitue une nouvelle cible thérapeutique du système rénine-angiotensine cérébral et que l'utilisation d'un inhibiteur de l'APA permet de réduire significativement la pression artérielle.

Les compositions pharmaceutiques revendiquées peuvent éventuellement contenir un ou plusieurs véhicules pharmaceutiquement acceptables. Ces véhicules sont choisis de manière à constituer une forme pharmaceutique administrable de façon classique par voie orale, transmuqueuse, parentérale ou rectale.

Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement thérapeutique adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc.

En conséquence, les compositions selon l'invention sont particulièrement intéressantes pour traiter l'hypertension artérielle essentielle au cours de laquelle l'hyperactivité sympathique observée souvent durant la phase précoce, est vraisemblablement médiée par une activité accrue du système rénine-angiotensine cérébral.

A titre illustratif mais non limitatif des troubles susceptibles d'être traités avec les compositions revendiquées, on peut notamment citer les insuffisances cardiaque et rénale, les troubles de l'homéostasie hydrodynamique et la réduction de la protéinurie chez les diabétiques.

En outre, les compositions selon l'invention peuvent être avantageusement utilisées en complément des bloqueurs du système rénine-angiotensine systémique.

A titre représentatif de ces bloqueurs, on peut notamment citer les inhibiteurs de l'enzyme de conversion tel que l'Enaprilate et les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II comme le Losartan.

Selon une variante de l'invention, la composition revendiquée comprend en outre un inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I ou un antagoniste des récepteurs AT1.

5 Ce type de bloqueurs du système rénine-angiotensine systémique s'avère efficace dans des pathologies comme l'hypertension, l'insuffisance cardiaque congestive, la dysfonction ventriculaire gauche après infarctus du myocarde, mais également dans la régression de la protéinurie chez les diabétiques et dans la réduction de la progression de l'insuffisance rénale chronique.

10 En agissant également au niveau du contrôle central de la pression artérielle et en bloquant l'activité du système rénine-angiotensine central via leur inhibiteur d'APA, les compositions revendiquées seront également efficaces pour traiter les infections évoquées ci-dessus.

15 L'invention s'étend également à l'utilisation d'un inhibiteur d'APA tel que défini ci-dessus, associé le cas échéant à un véhicule pharmaceutiquement acceptable pour la fabrication d'un médicament utile pour diminuer la pression artérielle.

20 Il peut notamment s'agir de l'acide (S) 3-amino 4-mercaptobutylsulfonique ou l'un de ses sels, pharmaceutiquement acceptables avec un acide ou une base.

Figures

25 Figure 1 : Evolution au cours du temps de la teneur en AngII tritiée dans l'hypothalamus murin en présence ou non de l'EC33.

Figure 2 : Représentation semilogarithmique des teneurs en AngII tritiée dans l'hypothalamus murin en absence (contrôle) ou en présence d'EC33 (30 µg).

30 Figure 3 : Effet de différentes doses d'EC33 injectées par voie intracérébroventriculaire sur la pression artérielle chez des rats SHR et WKY.

Figure 4 : Effet de différentes doses d'EC33 en terme de durée de l'effet sur la pression artérielle chez des rats SHR et WKY.

Figure 5 : Effet presseur d'un inhibiteur de l'APN, le PC18, chez les rats SHR.

Figure 6 : Effet en terme de durée d'un inhibiteur de l'APN, le PC18, sur la pression artérielle, chez le rat SHR.

5 Figure 7 : Effet presseur d'un inhibiteur de l'APN, le PC18, chez le rat normotendu en présence d'un antagoniste des récepteurs angiotensinergiques de type 1, AT1.

Figure 8 : Effet sur la pression artérielle de l'inhibiteur EC33 injecté par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) ou par voie intraveineuse (i.v.)
10 chez des rats vigiles normotendus (WKY) ou spontanément hypertendus (SHR).

MATERIELS ET METHODES

15

A. Composés :

L'EC33, (S)-3-amino-4-mercapto-butane sulfonate de sodium) est préparé selon les protocoles décrits dans Chauvel et al. J. Med. Chem. 37, 1339-1346 et 2950-2957.

20 Le PC 18, méthioninethiol est un inhibiteur sélectif et de haute affinité pour l'APN ($K_i = 9 \text{ nm}$). Il est préparé selon le protocole décrit dans Fournié-Zaluski et al., J. Med. Chem. 35, 1259-1266.

Les différentes formes d'angiotensine II et III considérées ci-après sont disponibles auprès des sociétés Amersham ou Sigma.

25

B. Animaux :

Des souris mâles suisses (disponibles auprès de l'Institut Iffa Credo) pesant 18 à 20 grammes sont maintenues sous lumière artificielle (12 heures en phase éclairée - 12 heures dans la pénombre) et disposent
30 d'aliments et d'eau ad libitum. Les expériences sont réalisées entre 9 h et 11 h dans la matinée. Les drogues sont administrées dans le ventricule latéral par

voie intracérébroventriculaire (I.C.V.) à un taux de 5µl par souris selon la méthode de Haley et McCormick (Br. J. Pharmacol. 12, 12-15).

Les rats utilisés sont des rats mâles Sprague-Dawley, pesant 200 à 250 grammes, certains d'entre eux sont des rats âgés de 11 semaines (SHR).
5 Des rats normotendus Wistar Kyoto sont également utilisés à titre de contrôle. Les animaux sont conservés pendant une semaine avec des périodes de luminosité et de pénombre de 12 heures alternées, et disposent d'eau et d'aliments ad libitum. Pour chaque expérience les rats SHR et WKY sont pesés et leur pression artérielle et leur rythme cardiaque sont enregistrés en continu
10 par voie invasive après la pose d'un cathéter (PE 50) dans l'artère fémorale. Le cathéter est relié à un capteur de pression (COBE) et connecté à un conditionnement de signaux relié à un amplificateur. Le système informatique comprend un système d'interface MacLab et un logiciel (Chart et Scope) d'application qui permet l'acquisition et le calcul des données par
15 l'intermédiaire d'un ordinateur MacIntosh.

C. Modes d'administration et méthodes d'analyse :

- Injection intracérébroventriculaire

20 Pour chaque expérience, six à huit souris sont utilisées pour chacune des conditions. Un mélange de $2 \cdot 10^6$ cpm [^3H]Ang II et 30 µg d'Ang II non marqués est administré dans un volume de 5 µl, conjointement ou non avec l'EC33 (30 µg). Les inhibiteurs sont dissous dans une solution saline isotonique ajustée à un pH de 7,4 avec une solution de NaOH à 0,01 M. A
25 différents temps après l'injection, les souris sont décapitées, leurs cerveaux prélevés et leurs hypothalamus disséqués sur la glace et homogénéisés par sonication (ultrasons, Anemasse, France) dans 10 volumes d'une solution à 0,1 M d'HCl refroidie dans de la glace. L'homogénéat est centrifugé à raison de $12\,000 \times g \times 20 \text{ min.}$ à 4 °C et le surnageant est conservé à -80 °C jusqu'à
30 l'analyse.

- Séparation des angiotensines II et III par chromatographie échangeuse d'ions.

Les quantités respectives en angiotensines II et III marquées présentes dans l'hypothalamus sont déterminées selon le protocole de Ledwith et al. (Anal. Biochem. 213, 349-355). Pour ce faire, un gel de sépharose à flux rapide (1/2 de volume mort, Pharmacia) est chargé dans des colonnes
5 seringues de 3 ml et équilibré à température ambiante avec 15 ml d'un tampon (10 mM acétate de sodium-50 mM NaCl, pH 5,0). Après avoir été décongelés, les extraits d'hypothalamus contenant environ 30 000 cpm sont dilués dans
10 2 ml de tampon d'équilibration, chargés sur les colonnes et lavés avec 1 ml de tampon. Une première fraction (F1) contenant de l'angiotensine II tritiée et d'autres métabolites de l'angiotensine tritiée est éluée avec 7 ml d'une solution de 10 mM d'acétate de sodium/80 mM NaCl/5 % d'acétonitrile à pH 5. Une
15 seconde fraction (F2) contenant de l'angiotensine III tritiée seule est éluée avec 3 ml d'une solution HCl 3 M. Les fractions F1 et F2 sont ensuite analysées par HPLC pour déterminer leur teneur respective en angiotensine II tritiée et en angiotensine III tritiée.

- Concentration par passage sur colonne C₁₈Sep-pak®.

20 Dans la perspective d'une analyse HPLC, les fractions F1 et F2 sont initialement concentrées par extraction sur un dispositif C₁₈Sep-pak® Cartridges (Waters). Pour cela, de l'acide trifluoroacétique (1 % à concentration finale) est ajouté à la fraction F1 qui est ensuite chargée sur
25 Sep-pak®, équilibrée au préalable avec une solution aqueuse en acide trifluoroacétique à 1 %. La fraction radioactive est éluée avec 1,5 ml d'acétonitrile à 100 %. Sous ces conditions on récupère 75 % en angiotensine II. La fraction F2 est chargée sur Sep-pak® équilibrée au préalable avec 2 ml d'une solution de méthanol à 100 % suivie par 5 ml d'eau. La fraction
30 radioactive est éluée avec 1,5 ml de méthanol à 100 %. On récupère ainsi 92 % en angiotensine III. Après élution sur Sep-pak®, les fractions F1 et F2 respectives sont lyophilisées, dissoutes dans 0,2 ml d'une solution d'acide

acétique à 0,01 M avec 20 ng d'angiotensine II et d'angiotensine III à titre d'étalon interne et analysées par HPLC.

- Analyse HPLC.

5 L'analyse HPLC est réalisée en utilisant une colonne à phase inverse H Hypersil ODS®-3 µm (Shandon, Pittsburgh) chauffée à 45 °C puis avec une élution isocratique à un flux de 0,6 ml par minute. La phase mobile consiste en H₃PO₄ 86 mmolaire, ajusté à pH 3 avec de la triéthylamine, et en 17,5 % d'acétonitrile. Après injection de l'échantillon (0,15 ml), des fractions de
10 0,10 ml sont collectées pendant 12 minutes. Leur teneur en radioactivité est estimée avec un compteur bêta. Dans de telles conditions, les temps de rétention des angiotensines témoins sont de 9,5 minutes pour l'angiotensine II et 7,8 minutes pour l'angiotensine III.

15

D. Mesure de l'activité APA *in vitro* :

Le dosage de l'activité APA est basé sur le protocole de Goldberg adapté à l'échelle de dosage sur microplaques (Pro Bind™ 3915) (Chauvel et
20 coll., 1994).

- Principe

In vitro, en présence d'ions calcium, l'APA hydrolyse l'α-L-glutamyl-β-naphtylamide (gluβNa) en glutamate et β-naphtylamine (βNa). Une
25 réaction de diazotation en milieu acide permet de révéler le β-naphtylamine par formation d'un complexe de couleur violette : une mesure de spectrophotométrie permet alors de connaître la quantité de complexe formé et, par référence à une gamme étalon réalisée avec des concentrations croissantes de β-naphtylamine, d'en déduire l'activité enzymatique de
30 l'échantillon.

- Réactifs

Le substrat GluβNa et le β-naphtylamine (Bachem) sont solubilisés dans le DMSO (diméthyl sulfoxyde) et l'HCl 0,1 N respectivement, et conservés à -20°C à la concentration de 10^{-2} M. La réaction de diazotation se fait en présence de nitrite de sodium (87mM), de sulfamate d'ammonium (130 mM) et du N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochloride (23 mM).

- Réaction enzymatique

La réaction a lieu à pH 7,4 en tampon Tris-HCl 50 mM, en présence de calcium (CaCl_2 , 4 mM) ; l'échantillon à doser est incubé à 37°C en présence de substrat (GluβNa, 200 μM) et en absence ou en présence de différentes concentrations de l'inhibiteur à tester dans un volume final de 100μl. La réaction est arrêtée par addition de 10 μl d'HCl 3N. Une gamme étalon de β-naphtylamine en milieu acide (ajouter 10 μl d'HCl 0,1 N) est effectuée en parallèle.

- Révélation du produit formé

On ajoute dans chaque puits :

. 25 μl de nitrite de sodium (mélanger, attendre 5 minutes à température ambiante),

. 50 μl de sulfamate d'ammonium (agiter, attendre 5 minutes à température ambiante), puis

. 25 μl de N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochloride 23 mM (mélanger, attendre la stabilisation de la couleur violette environ 30 minutes à 37°C).

L'absorbance est ensuite mesurée à 540 nm.

E. Mesure de l'activité APN

Le principe du dosage repose sur l'hydrolyse de la [3H] Leu-enképhaline (10 nM) par l'APN en deux métabolites, la [3H] Tyr et le tétrapeptide Gly-Gly-Phe-Leu. Une fois la réaction arrêtée, le métabolite [3H]

est isolé sur colonne de Porapak et sa radioactivité est estimée par scintillation liquide. L'activité de l'APN est estimée en fmoles de substrat hydrolysé/min/mg de protéine.

5

F. Estimation du pouvoir inhibiteur de l'EC33 et du PC18

Le pouvoir inhibiteur de l'EC33 et du PC18 sur l'APA ou l'APN est estimé en mesurant l'activité enzymatique de l'APA ou l'APN purifiées en présence de concentrations croissantes de l'inhibiteur. A partir de ces données, la concentration efficace 50 est calculée d'après un programme de régression non linéaire des moindres carrés Graph Pad PRISM™, version 2), ce qui permet de déduire le KI de ces molécules d'après la formule suivante :

15

$$KI = \frac{IC50}{1 + \frac{Km}{[S]}}$$

Le Km de l'APA pour le GluβNa est de 100 μM (Vazeux et coll., J. biochem., 1996, vol. 271 :9069-9074).

Le Km de l'APN pour la Leu-enképhaline est de 50 μM (Chauvel et coll., J. Med. Chem., 1994, vol. 37:2950-2956).

20

EXEMPLE 1 :

Test *in vitro* du pouvoir inhibiteur de l'EC33 et du PC18 sur l'APA et l'APN.

25 Ces pouvoirs inhibiteurs sont estimés conformément au protocole décrit dans le chapitre "matériels et méthodes".

L'EC33 présente un KI de 2,5±0,6. 10⁻⁷ M pour l'APA et un facteur de sélectivité d'environ 100 par rapport à l'APN (25±11, 10⁻⁶ M).

30 Le pouvoir inhibiteur du PC18 sur l'APN est de 1,1±0,1 10⁻⁸ M, il est 1000 fois moins actif sur l'APA (11±1,7, 10⁻⁶ M).

EXEMPLE 2 :**Effet *in vivo* de l'inhibiteur EC33 sur le métabolisme des angiotensines cérébrales AngII et AngIII présentes dans l'hypothalamus murin.**

5

Les cinétiques d'apparition et de disparition dans l'hypothalamus des angiotensines II et III radiomarquées sont déterminées après avoir injecté chez la souris par voie intracérébroventriculaire une quantité connue d'AngII tritiée ($2 \cdot 10^6$ cpm) avec 30 µg d'AngII non radioactive, en présence ou en absence de l'inhibiteur (EC33, 30 µg). Les taux de peptides tritiés dans les

10 tissus sont quantifiés selon le protocole décrit dans le chapitre Matériels et méthodes par HPLC.

L'évolution de la teneur en AngII [^3H] dans l'hypothalamus après injection i.c.v. d'AngII [^3H], en absence ou en présence de l'EC33 est reportée

15 en figure 1.

Chez la souris témoin, la teneur en AngII [^3H] décroît rapidement après 1,5 minutes et n'est plus détectable au delà de 7 minutes. En présence de l'EC33, cette teneur en AngII [^3H] est significativement augmentée entre 0,5 et 7 minutes pour atteindre environ 11 fois la teneur de l'essai témoin.

20 Une représentation sémi-logarithmique du taux de disparition en teneur AngII [^3H] en présence de l'EC33 par rapport au contrôle est présentée en figure 2.

On note que chez l'animal traité avec EC33, la demi vie de l'AngII [^3H], ($5,38 \pm 0,21$ min) est augmentée d'un facteur 2,6 comparativement à

25 celle d'un animal témoin.

Chez la souris témoin, la formation d'AngIII tritiée est maximale à 1 minute et les taux diminuent progressivement jusqu'à 10 minutes. En présence d'EC 33, la formation d'AngIII tritiée est immédiatement bloquée et des taux très faibles sont mesurés tout au long de l'expérience.

30

EXEMPLE 3 :**Effet *in vivo* de l'inhibiteur EC33 sur une augmentation de pression artérielle induite par AngII.**

5 Ces expériences sont effectuées chez le rat normotendu Wistar Kyoto (WKY) ou spontanément hypertendu (SHR âgé de 12 semaines).

Les animaux sont anesthésiés à l'Inactine (5-éthyl-2-(1-méthyl-propyl)-2-thiobarbiturale) anesthésique utilisé régulièrement dans les expériences de physiologie rénale ou cardiovasculaire. Ses caractéristiques
10 sont d'entraîner une très faible baisse de la pression artérielle, visible uniquement chez le rat SHR, et surtout de permettre le maintien d'une pression artérielle de base stable tout au long de l'expérience.

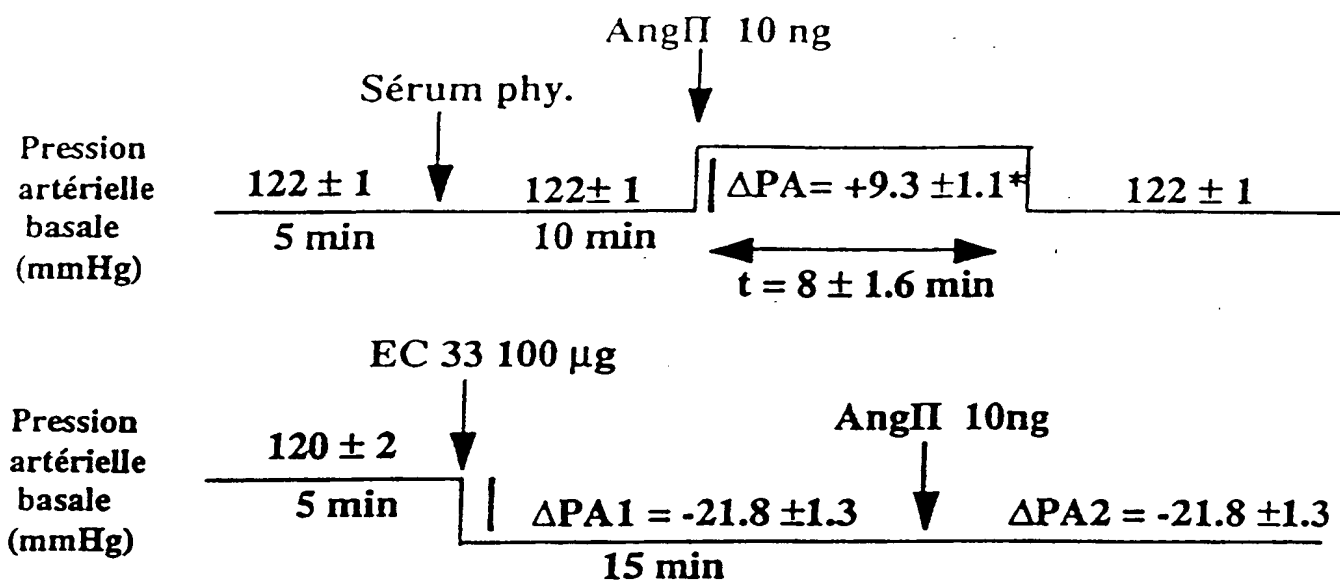
La pression artérielle moyenne (systolique + diastolique) est mesurée en continu, par voie invasive, après cathétérisme de l'artère fémorale.
15 Les peptide ou les inhibiteurs sont injectés par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) à l'aide d'une canule placée dans le ventricule latéral, sous stéréotaxie (Atlas stéréotaxique ; G. Paxinos et C. Watson, Academic Press, 1986).

Les expériences sont réalisées sur des groupes de 4 à 20
20 animaux analysés individuellement. Les résultats sur des lots d'animaux témoins et traités ont été comparés à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA) suivi d'un test de Student non apparié.

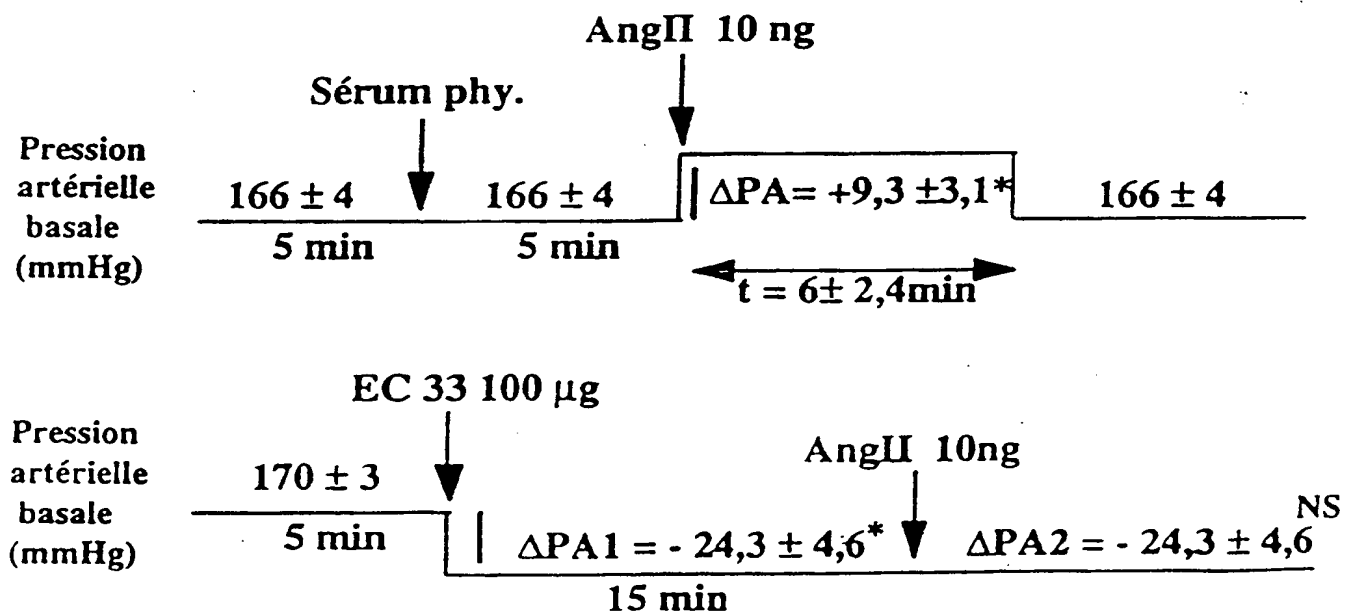
Il est procédé à une injection d'angiotensine II associée, le cas échéant, à une injection consécutive d'EC33.

25 Les essais sont réalisés selon les schémas ci-après qui rendent également compte des résultats obtenus.

WKY



SHR

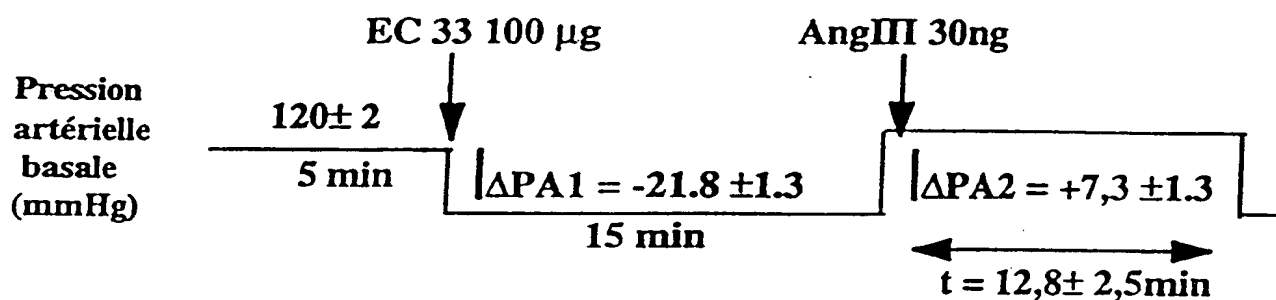
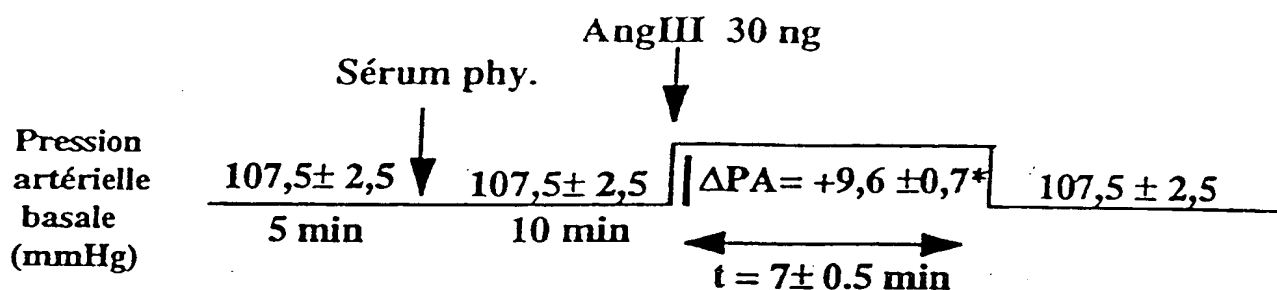


On note que l'AngII à une dose de 10 ng augmente significativement la pression artérielle (PA). L'effet étant légèrement plus important chez le rat SHR que chez le rat WKY. L'amplitude maximale de l'effet est d'environ 10 mm Hg pour 10 ng d'AngII et la durée d'action se situe entre 7 et 9 minutes.

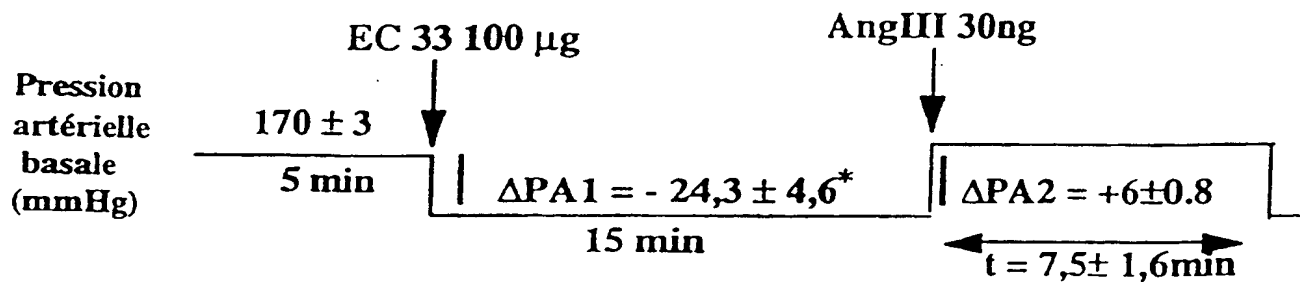
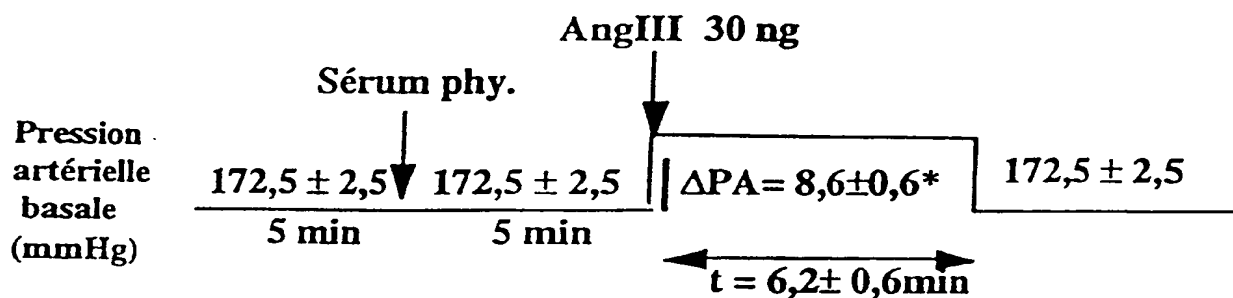
Lorsque l'AngII (10 ng) est injectée en présence de 100 µg de l'inhibiteur d'aminopeptidase A, l'EC33, l'effet presseur de l'AngII est complètement aboli.

La spécificité d'action de l'EC33 a également été démontrée par son inefficacité à modifier l'effet presseur de l'AngIII (30 ng). Les schémas figurant ci-après rendent compte des résultats obtenus.

WKY



SHR



L'effet dose dépendante de l'EC33 injecté seul a également été apprécié sur les plans durées d'action et effet hypotenseur. Les résultats obtenus sont représentés en figures 3 et 4.

De manière générale, lorsque l'on bloque l'APA par l'EC33, on observe une baisse de PA dose dépendante, plus marquée chez le rat hypertendu que chez le rat normotendu. L'effet hypotenseur de l'inhibiteur de l'APA est maximal pour une dose de 100 µg. Il est de -22 mm Hg chez le rat normotendu et de -28 mm Hg chez le rat hypertendu.

La durée d'action à cette dose est en moyenne entre 40 et 60 minutes.

En conséquence, ces données indiquent que dans les conditions basales, l'angiotensine III endogène exerce un effet tonique positif sur le contrôle central de la pression artérielle.

15

EXEMPLE 4 :

Démonstration du rôle déterminant de l'AngIII dans le système rénine-angiotensine cérébral.

Cet essai est effectué à l'aide d'un inhibiteur de l'aminopeptidase N (APN), le PC18 (3-amino-4-mercaptométhionine). Cette APN est responsable de la dégradation de l'angiotensine III en angiotensine IV.

Conformément au protocole décrit en exemple 3, on injecte l'AngIII (10 ng) en présence de 60 µg, de PC18 chez le rat SHR. A titre d'essai témoin, il est procédé à une injection de PC18 seul.

L'effet de cette co-injection est appréciée en terme de pression artérielle et de durée et les résultats obtenus sont présents en figures 5 et 6.

On observe une potentialisation de l'effet presseur de l'Ang III (10 ng) en prenant de l'inhibiteur PC18 (60 µg). A 60 µg, le PC18 seul augmente chez le rat SHR, la pression artérielle de 15 mm Hg et l'effet dure environ 12 minutes.

Par ailleurs, il a également été montré chez le rat normotendu ou hypertendu, que l'augmentation de pression artérielle (+ 10 ou + 13 mm Hg respectivement) induite par 60 µg de PC18 est antagonisée par un prétraitement avec un antagoniste de récepteurs angiotensinergiques de type 1 (AT1), le Losartan (10 µg). Ceci est en particulier illustré en figure 7 pour le rat normotendu.

Cet effet antagoniste est de l'ordre de 85 % chez le rat normotendu et de 52% chez le rat hypertendu.

De ces données, il ressort que l'effet presseur du PC18 est dû à une accumulation de l'AngIII endogène via les récepteurs AT1.

EXEMPLE 5 :

Effet sur la pression artérielle de l'inhibiteur EC33 injecté par voie intracérébroventriculaire (i.c.v.) ou par voie intraveineuse (i.v.) chez des rats vigiles.

Ces expériences sont effectuées chez le rat SHR âgé de 12 semaines (300-350 g). Pendant l'opération, les animaux sont anesthésiés ponctuellement (3 heures) avec du pentobarbital sordique (50 mg/kg intrapéritonéal, Laboratoire Sentravet, Plancoët, France). Les expériences sont réalisées au minimum 24 heures après l'opération.

– injection par voie i.c.v.

Les injections sont réalisées à l'aide d'une canule placée dans le ventricule latéral, sous stéréotaxie et la pression artérielle est mesurée en continu par voie invasive après cathétérisme de l'artère fémorale. Le cathéter est extériorisé au niveau de la nuque de l'animal et relié à un système de fixation permettant au rat de se mouvoir librement dans sa cage.

– injection par voie i.v.

Un premier cathéter est placé dans la veine fémorale afin de réaliser les injections, un second cathéter est introduit dans l'artère fémorale

afin de pouvoir mesurer la pression artérielle en continu. Les deux catéthers sont ensuite extériorisés comme indiqué ci-dessus.

Les résultats obtenus sont représentés en figure 8.

On note que chez les rats SHR vigiles, l'injection i.c.v. de l'EC33 à
5 une dose de 100 µg diminue significativement la pression artérielle (-26 mmHg)
du même ordre que chez les animaux anesthésiés (-28 mmHg) (Fig. b). Cet
effet hypotenseur dure cependant moins longtemps (40 min).

En revanche, injectée par voie i.v., l'EC33 à une dose de
45 mg/kg n'induit pas d'effet hypotenseur significatif chez les rats SHR vigiles
10 (Fig. c).

Ces résultats montrent donc que l'AngIII cérébrale endogène
exerce une action tonique dans la régulation de la pression artérielle aussi bien
chez le rat anesthésié que chez le rat vigile. Les résultats obtenus à la
périphérie montrent que le blocage de la conversion de l'AngII circulante en
15 AngIII n'induit pas de modification significative de la pression artérielle.

Ceci suggère que l'APA cérébrale joue un rôle prépondérant dans
la régulation de la pression artérielle comparée à l'APA périphérique qui
semble avoir une contribution moins importante.

REVENDICATIONS

1. Composition pharmaceutique utile pour diminuer la pression
5 artérielle caractérisée en ce qu'elle comprend à titre de principe actif au moins
un inhibiteur sélectif de l'aminopeptidase A.

2. Composition selon la revendication 1 caractérisée en ce que
cet inhibiteur possède une affinité multipliée environ d'au moins un facteur 100
10 pour l'aminopeptidase A comparativement à l'aminopeptidase N.

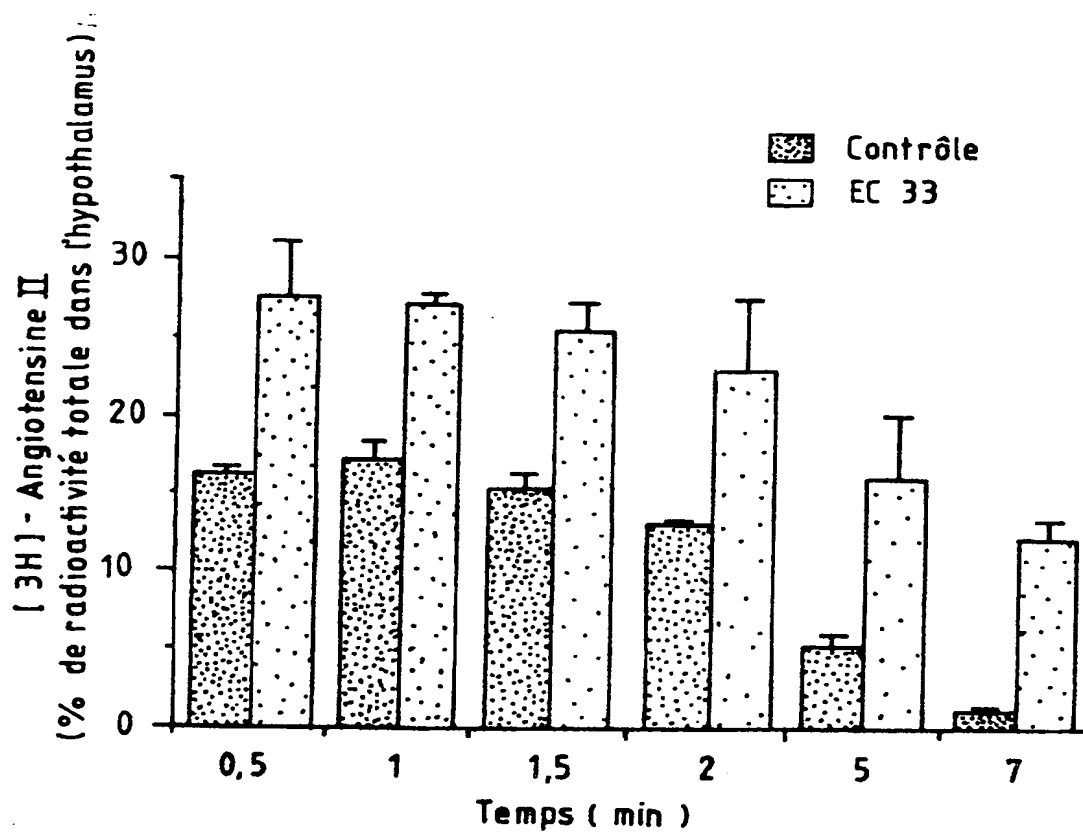
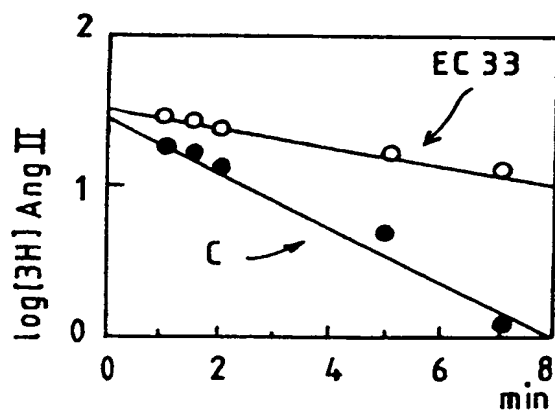
3. Composition selon la revendication 1 ou 2 caractérisée en ce
que l'inhibiteur est l'acide (S) 3-amino-4-mercaptobutylsulfonique ou l'un de
ses sels avec un acide ou une base pharmaceutiquement acceptable.
15

4. Composition selon l'une des revendications précédentes
caractérisée en ce qu'elle comprend en outre au moins un véhicule
pharmaceutiquement acceptable.

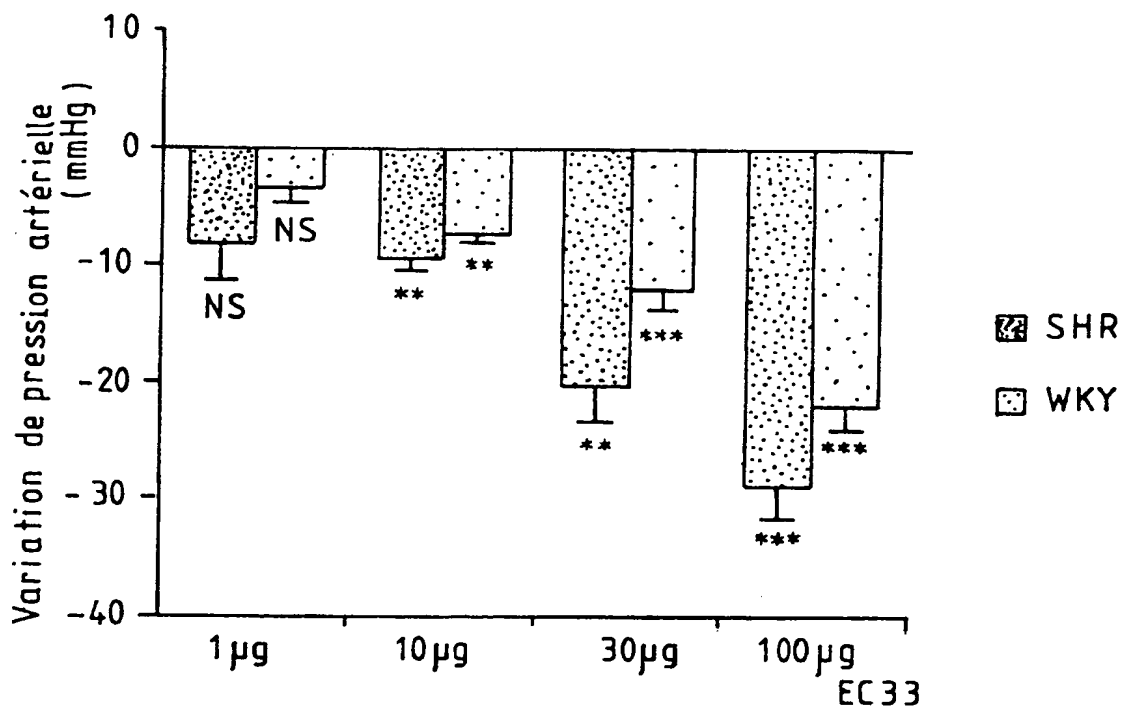
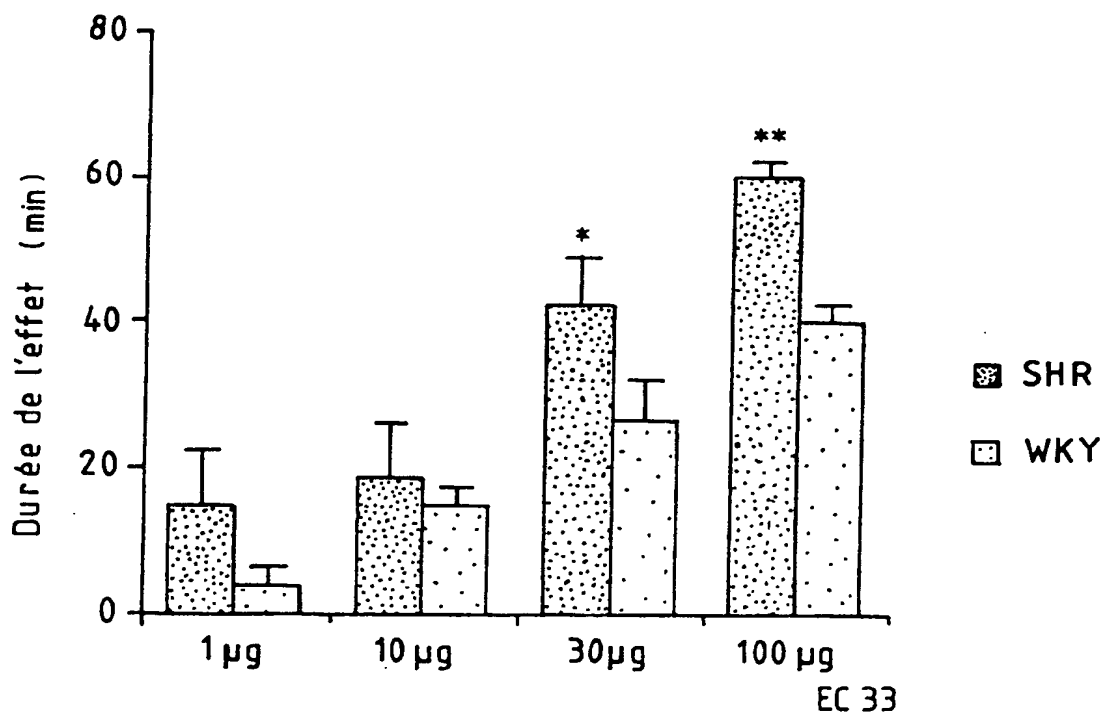
20 5. Composition selon l'une des revendications précédentes,
caractérisée en ce qu'elle comprend en outre un inhibiteur de l'enzyme de
conversion de l'angiotensine I ou un antagoniste des récepteurs AT1.

25 6. Utilisation d'un inhibiteur de l'aminopeptidase A tel que défini
en revendication 1 à 3 associé le cas échéant à un véhicule
pharmaceutiquement acceptable pour la fabrication d'un médicament utile pour
diminuer la pression artérielle.

1/5

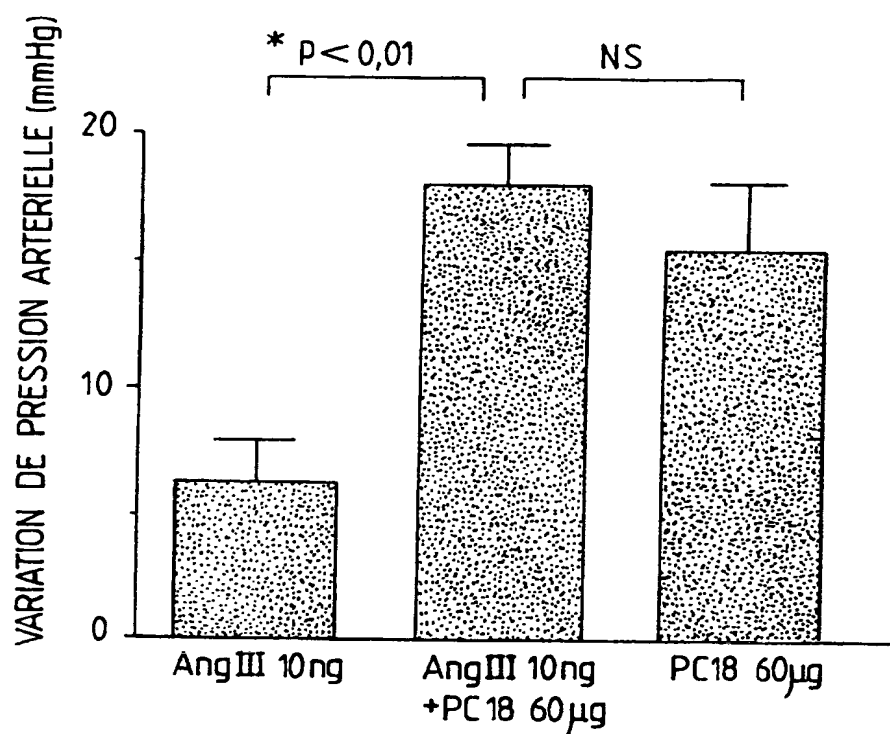
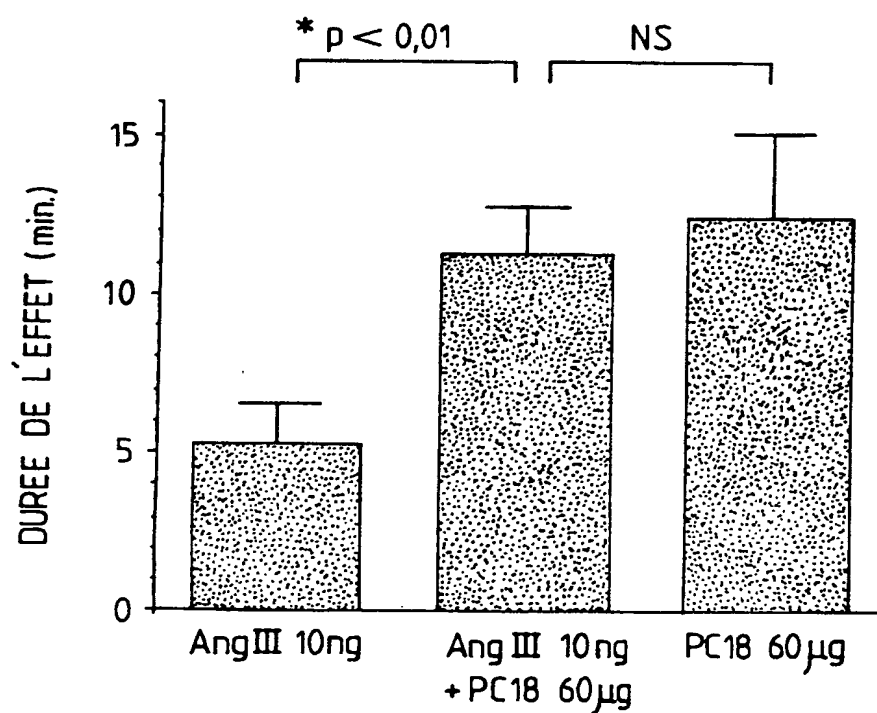
**FIG.1****FIG.2**

2/5

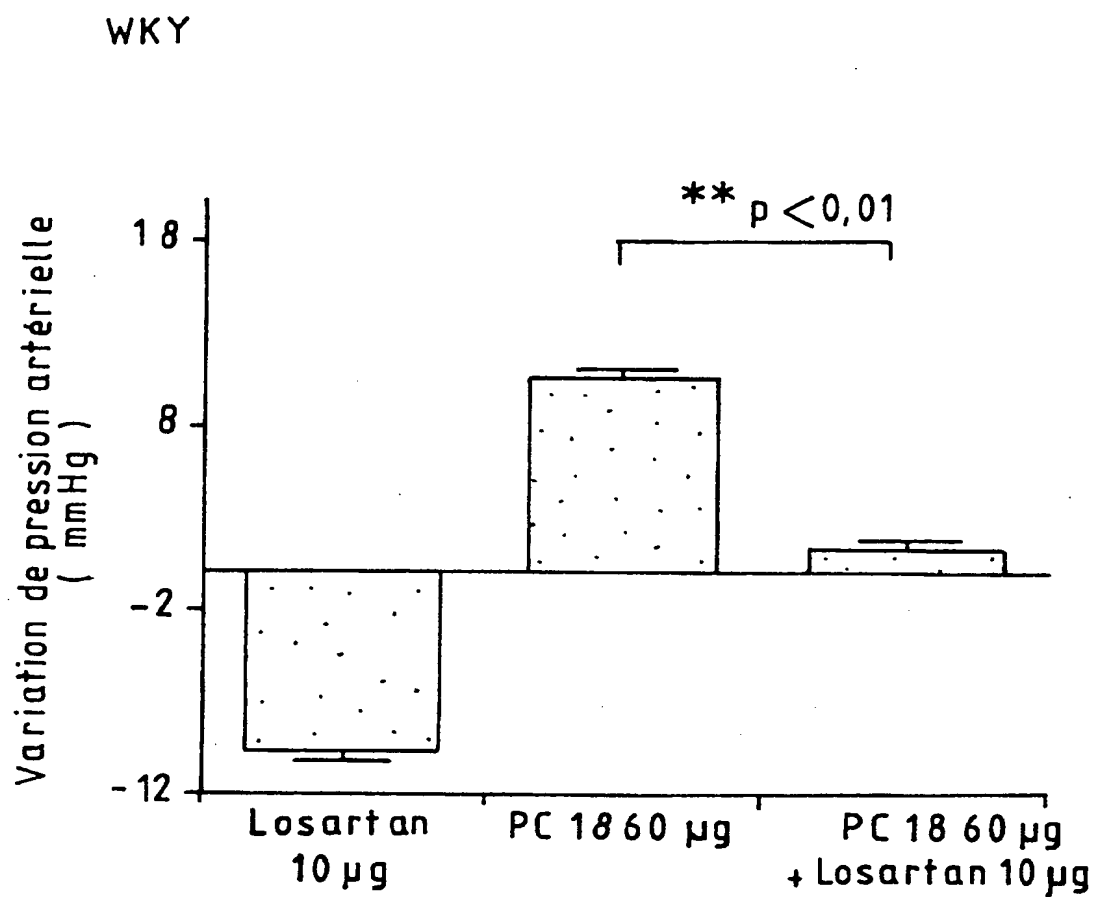
**FIG.3****FIG.4**

3/5

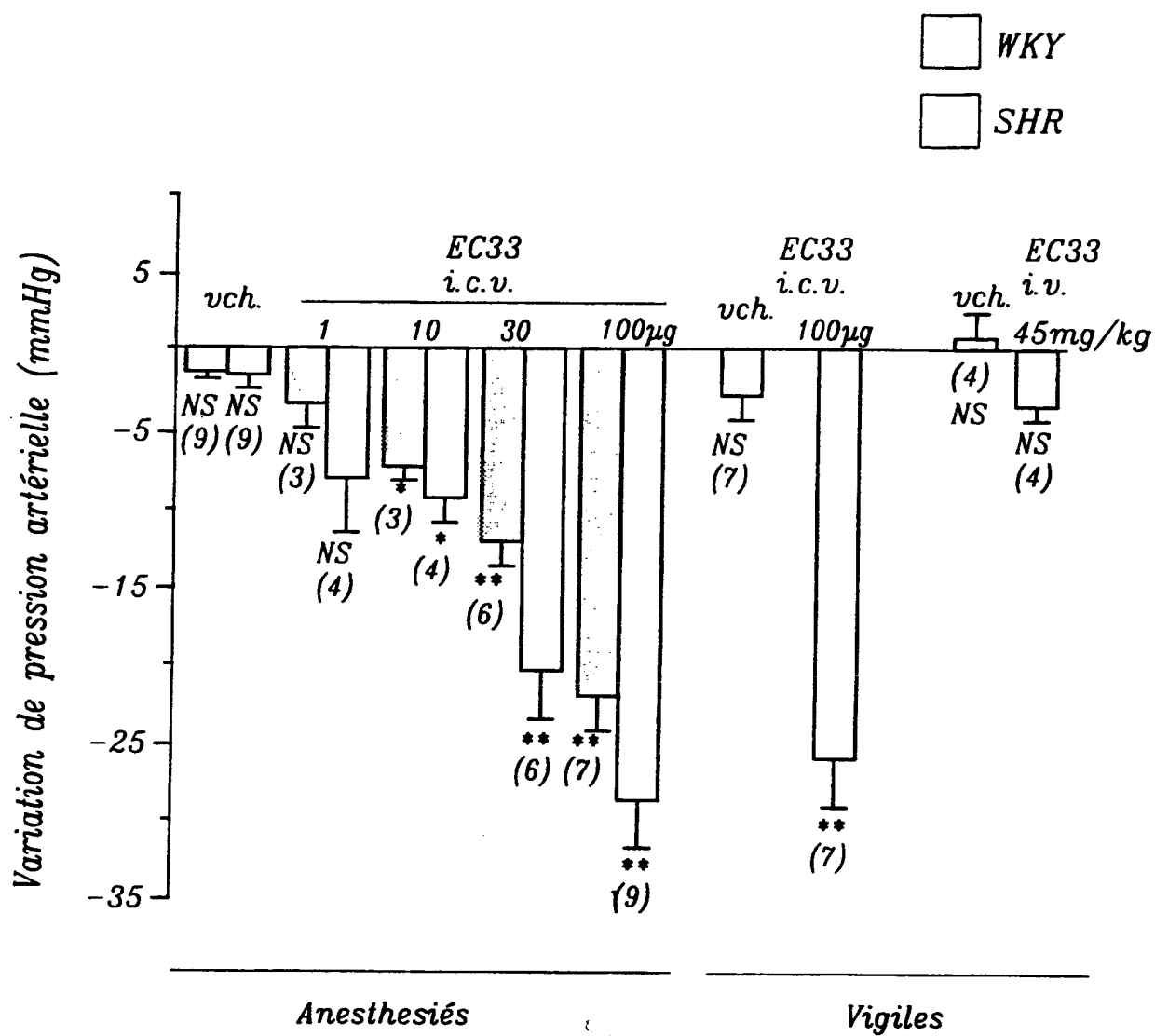
SHR

**FIG.5****FIG.6**

4/5

**FIG.7**

5/5

**FIG.8**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/FR 99/00059

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/185

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHAUVEL ET AL.: "Differential Inhibition of Aminopeptidase A and Aminopeptidase N by New beta-Amino Thiols"</p> <p>J. MED. CHEM., vol. 37, no. 18, 1994, pages 2950-2957, XP002068832 abstract see page 2952, column 1, paragraph 3 - column 2, paragraph 1; tables 1,2</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-4

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 June 1999

Date of mailing of the international search report

06/07/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office. P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

A. Jakobs

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/FR 99/00059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZINI ET AL.: "Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors : Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 93, no. 21, 1996, pages 11968-11973, XP002068833 abstract see page 11971, column 2, paragraph 1 - page 11973, column 1, paragraph 1; figures 1-7 ---	1-4
X	CHAUVEL ET AL.: "Investigation of the Active Site of Aminopeptidase A Using a Series of New Thiol-Containing Inhibitors" J. MED. CHEM., vol. 37, no. 9, 1994, pages 1339-1346, XP002068834 see abstract ---	1,2
X	RAMIREZ ET AL.: "Renal aminopeptidase activities in animal models of hypertension" REGULATORY PEPTIDES, vol. 72, no. 2,3, 1997, pages 155-159, XP002068835 see abstract ---	1,2
X	AHMAD ET AL.: "Role of Aminopeptidase Activity in the Regulation of the PResor Activity of Circulating Angiotensins" J. PHARMACOL. EXP. THER., vol. 252, no. 2, 1990, pages 643-650, XP002068836 see abstract ---	1,2
X	SULLIVAN ET AL.: "Differentail effects of aminopeptidase inhibitors on angiotensin-induced pressor responses" BRAIN RESEARCH, vol. 456, no. 2, 1988, pages 249-253, XP002068837 see page 251, column 2, paragraph 2 - page 252, column 2, paragraph 2; figure 2 ---	1,2
X	APPENRODT ET AL.: "Effects of Central Angiotensin II and Angiotensin III on Baroreflex Regulation" NEUROPEPTIDES, vol. 26, no. 3, 1994, pages 175-180, XP002068838 see abstract ---	1,2
	--- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No

PCT/FR 99/00059

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WRIGHT ET AL.: "Aminopeptidase-induced elevations and reductions in blood pressure in the spontaneously hypertensive rat"</p> <p>JOURNAL OF HYPERTENSION, vol. 8, no. 10, 1990, pages 969-974, XP002068839 see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
X	<p>SONG ET AL.: "Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses"</p> <p>BRAIN RESEARCH, vol. 744, no. 1, 1997, pages 1-6, XP002068840 see abstract; figures 1-4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 99/00059

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplementary sheet FOLLOW-UP INFORMATION PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Claims 1-2, 4-6 concern a considerable number of possible compounds. In fact said claims lack clarity as defined by PCT Article 6 such that it was virtually impossible to carry out an exhaustive search. The invention concerns a pharmaceutical composition solely defined by means of a pharmacological parameter. Characterizing a pharmaceutical composition solely by means of one of its parameters can conceal lack of novelty. The search was restricted to the compounds for which pharmacological data were supplied and/or the compounds mentioned in the claims.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 99/00059

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 6 A61K31/185

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>CHAUVEL ET AL.: "Differential Inhibition of Amino peptidase A and Amino peptidase N by New beta-Amino Thiols"</p> <p>J. MED. CHEM., vol. 37, no. 18, 1994, pages 2950-2957, XP002068832</p> <p>abrégé voir page 2952, colonne 1, alinéa 3 - colonne 2, alinéa 1; tableaux 1,2</p> <p>--- -/--</p>	1-4

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☐ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cite pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 juin 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/07/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

A. Jakobs

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. internationale No

PCT/FR 99/00059

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>ZINI ET AL.: "Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors : Predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release" PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 93, no. 21, 1996, pages 11968-11973, XP002068833 abrégé voir page 11971, colonne 2, alinéa 1 - page 11973, colonne 1, alinéa 1; figures 1-7</p> <p>---</p>	1-4
X	<p>CHAUVEL ET AL.: "Investigation of the Active Site of Aminopeptidase A Using a Series of New Thiol-Containing Inhibitors" J. MED. CHEM., vol. 37, no. 9, 1994, pages 1339-1346, XP002068834 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>RAMIREZ ET AL.: "Renal aminopeptidase activities in animal models of hypertension" REGULATORY PEPTIDES, vol. 72, no. 2,3, 1997, pages 155-159, XP002068835 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>AHMAD ET AL.: "Role of Aminopeptidase Activity in the Regulation of the Pressor Activity of Circulating Angiotensins" J. PHARMACOL. EXP. THER., vol. 252, no. 2, 1990, pages 643-650, XP002068836 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>SULLIVAN ET AL.: "Differential effects of aminopeptidase inhibitors on angiotensin-induced pressor responses" BRAIN RESEARCH, vol. 456, no. 2, 1988, pages 249-253, XP002068837 voir page 251, colonne 2, alinéa 2 - page 252, colonne 2, alinéa 2; figure 2</p> <p>---</p>	1,2
X	<p>APPENRODT ET AL.: "Effects of Central Angiotensin II and Angiotensin III on Baroreflex Regulation" NEUROPEPTIDES, vol. 26, no. 3, 1994, pages 175-180, XP002068838 voir abrégé</p> <p>---</p>	1,2
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dén. Internationale No
PCT/FR 99/00059

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WRIGHT ET AL.: "Aminopeptidase-induced elevations and reductions in blood pressure in the spontaneously hypertensive rat"</p> <p>JOURNAL OF HYPERTENSION, vol. 8, no. 10, 1990, pages 969-974, XP002068839 voir abrégé</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2
X	<p>SONG ET AL.: "Aminopeptidase A antiserum inhibits intracerebroventricular angiotensin II-induced dipsogenic and pressor responses"</p> <p>BRAIN RESEARCH, vol. 744, no. 1, 1997, pages 1-6, XP002068840 voir abrégé; figures 1-4</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,2

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR 99/ 00059

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

This Page Blank (asptc)

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/SA/ 210

Les revendications 1-2,4-6 se réfèrent à un nombre considérable de composés possibles. En fait ces revendications manquent de clarté au sens de l'article 6 PCT de telle sorte qu'une recherche complète est virtuellement impossible. L'invention porte sur une composition pharmaceutique définie uniquement à l'aide d'un paramètre pharmacologique. La caractérisation d'une composition pharmaceutique uniquement à l'aide d'un de ses paramètres peut dissimuler l'absence de nouveauté. La recherche a été limitée aux composés pour lesquels des données pharmacologiques sont fournies et/ou aux composés mentionnés dans les revendications.

This Page Blank (except)